

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Tina Rora

6862/PT

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BEZGLUTENSKOG KISELOG
TIJESTA I KRUHA FRAP METODOM
ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog rada: Primjena vakuumskog hlađenja u proizvodnji hrane produjene trajnosti i svježine, HRZZ 09.01/279

Mentor: Doc. dr. sc. Marina Krpan

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BEZGLUTENSKOG KISELOG TIJESTA I KRUHA FRAP METODOM

Tina Rora, 0058204295

Sažetak: U današnjem modernom svijetu sve je više ljudi izloženo svakodnevnom stresu zbog čega se javljaju različite bolesti, a time i potreba za pravilnom i nutritivno kvalitetnijom prehranom. Broj oboljelih od celijakije je sve veći pa je i potražnja za bezglutenskim proizvodima u svakodnevnom porastu. S obzirom da je bezglutenski kruh nutritivno siromašan, potrebno ga je obogatiti različitim dodacima. Također, moderne metode proizvodnje kruha upotrebom pekarskog kvasca *S. cerevisiae* i kratkotrajna fermentacija daju kruh lošije kvalitete i trajnosti zbog čega se sve više pribjegava proizvodnji kruha uz dodatak kiselog tijesta. Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi utjecaj brašna žutog graška i kiseljenja tijesta pomoću bakterija mliječne kiseline (BMK) na antioksidativnu aktivnost bezglutenskog kiselog tijesta i kruha. Utvrđeno je da kiseljenje s različitim kulturama BMK povećava antioksidacijsku aktivnost, dok je dodatak brašna žutog graška smanjuje.

Ključne riječi: bezglutenski kruh, brašno žutog graška, celijakija, FRAP, kiselo tijesto

Rad sadrži: 26 stranica, 8 slika, 1 tablica, 29 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marina Krpan

Pomoć pri izradi: Saša Drakula, mag.ing.

Rad predan: 30. kolovoza 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food technology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

THE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GLUTEN-FREE SOURDOUGH AND BREAD WITH FRAP METHOD

Tina Rora, 0058204295

Abstract: In today's modern world, more and more people are exposed to daily stress, which is why there is even more different illnesses and need for healthy and nutritious nutrition grows. The number of celiac patients is increasing, so demand for gluten-free products is daily growing. Since the gluten-free bread is nutritiously poor, it is necessary to enrich it with various supplements. Also, modern methods of bread making using baker's yeast *S. cerevisiae* and short-term fermentation negatively affect breads quality and durability which is why bakery industry is increasingly using the addition of sourdough. The aim of this study was to determine the influence of addition of yellow pea flour and sourdough prepared with different lactic acid bacteria (LAB) on the antioxidant activity of gluten-free sourdough and bread. It was found that fermentation with different LAB cultures increases antioxidant activity, while the addition of yellow pea flour reduces it.

Keywords: celiac disease, FRAP, gluten-free bread, sourdough, yellow pea flour

Thesis contains: 26 pages, 8 figures, 1 table, 29 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: *PhD Marina Krpan, Assistant Professor*

Technical support and assistance: *Saša Drakula, BSc*

Thesis delivered: August 30th 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kruh.....	2
2.2. Celijakija	3
2.3. Bezglutenski kruh	5
2.4. Mahunarke	6
2.4.1. Grašak.....	6
2.4.1.1. Brašno graška	7
2.5. Kiselo tijesto	7
2.6. Tehnološki procesi u proizvodnji kiselog tijesta	8
2.7. Oksidacijski stres i antioksidansi	9
2.8. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.2. Metode rada	14
3.2.1. Obrada podataka.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA	20

1. UVOD

Prirodno kiselo tijesto načinjeno je od brašna, vode i mikroorganizama u aktivnom stanju, odnosno kvasaca i bakterija mliječne kiseline (BMK). Upotreba BMK u pripremi kruha ima dugu tradiciju, od spontanijih fermentacija gdje je njihova uloga bila samo dizanje tijesta, preko definiranih starter kultura, do razvoja i primjene funkcionalnih starter kultura. Tijekom fermentacije tijesta, BMK proizvode mliječnu i octenu kiselinu te brojne druge metabolite kao što su alkoholi, aldehidi i esteri, koji gotovom pekarskom proizvodu daju specifičnu aromu. Usto, dodatak kiselog tijesta pozitivno utječe na tehnološke, mikrobiološke, nutritivne, zdravstvene i organoleptičke karakteristike gotovog proizvoda. Kruh koji je proizveden uz dodatak kiselog tijesta je produljene trajnosti te kvalitetnijeg okusa, mirisa i teksture. Osobe koje boluju od celijakije moraju paziti na prisutnost glutena u kruhu i ostalim pekarskim proizvodima. Stoga oni biraju bezglutenske proizvode, koji ne sadrže navedeni protein odgovoran za elastične karakteristike i poroznost tijesta te koji doprinosi volumenu i strukturi proizvoda. Međutim, bezglutenski proizvodi su lošije kvalitete i nutritivno su siromašni te ih je stoga potrebno obogaćivati različitim dodacima. Svakodnevni način života uz povećanu dozu stresa, fizičkog opterećenja i nesanicu dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala, molekula koje imaju nespareni elektron i zbog toga su izuzetno reaktivne. Njihovo prekomjerno lučenje te nastanak oksidacijskog stresa dovodi do nastanka brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, dijabetes te autoimune bolesti. Zdravijim načinom života i pravilnijom prehranom uvelike možemo utjecati na pojedine izvore slobodnih radikala te smanjiti razinu oksidacijskog stresa u organizmu.

Cilj ovog rada bio je utvrditi kako dodatak različitih BMK roda *Lactobacillus* i brašna žutog graška u kiselo tijesto i kruh utječu na antioksidativnu aktivnost konačnog proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kruh

Općenito se pod pojmom kruh podrazumijevaju različite vrste kruha i peciva koje se međusobno razlikuju po obliku, masi, izgledu kore i sredine, mekoći, boji, okusu i mirisu. Svaka vrsta kruha spoj je određenih osobina karakterističnih baš za tu vrstu te ne znači da ono što je dobro za jednu vrstu kruha, da je dobro i za ostale vrste, i obrnuto. Proizvodnja kruha slijedi postupak koji ovisi o sastojcima, temperaturi, dok se proces proizvodnje kruha može razlikovati s obzirom na vrstu kruha. Provođa se u velikim količinama, bilo u kućanstvima za potrebe obitelji, ili u većim ili manjim pekarnicama za potrebe stanovništva. Iako su postupci proizvodnje različiti gotovo za svaku vrstu kruha i peciva, osnovne sirovine su svima jednake: brašno, kvasac, sol i voda. Uz osnovne sastojke, u današnje vrijeme dodaju se poboljšivači i različite smjese kako bi kruh ili pecivo bilo što kvalitetnije i raznovrsnije. Također su svima jednaki i sljedeći postupci:

- 1) Postupkom miješanja se u tijesto moraju ugraditi mjehurići zraka koji će se poslije rastezati i ispuniti plinovima.
- 2) U tijesto se obavezno mora dodati kvasac i dovoljno hrane za njega kako bi mogao proizvoditi dovoljne količine ugljikovog dioksida (CO_2) koji ispunjava nastale šupljine i diže tijesto.
- 3) Tijesto mora biti pravilno zamiješano da se dobro razvije, zadrži sve plinove te da kruh dobije odgovarajuću rahlu strukturu i volumen (Anonymous 1).

Postupak dobivanja tijesta započinje miješanjem brašna, vode, kvasca i ostalih sastojaka. Čestice upijaju vodu i pod utjecajem određenog mješalica u mijesilici se gibaju po posudi i na kraju nastane tijesto viskoelastične konzistencije. Tijekom zamijesivanja u tijesto ulazi zrak u obliku mjehurića koji čine šupljine u koje se kasnije, tijekom fermentacije, ugrađuje CO_2 . Tijesto se oblikuje i fermentira djelovanjem kvasca do zrelosti za pečenje. U prvih nekoliko minuta nakon stavljanja u peć, dolazi do pojave izrazitih promjena. Dolazi do ubrzavanja aktivnosti kvasca i enzima pri čemu nastaje više CO_2 zbog čega se povećava volumen tijesta, škrob počinje upijati vodu i bubriti, glutenska mreža se razvlači i denaturira te čini kostur kruha, dok se površina kruha pretvara u koru, a voda i hlapljivi sastojci isparavaju iz tijesta. Rastom temperature do 90-95 °C tijesto prestaje biti rastezljivo i počinje dobivati

svoja elastična svojstva. O vrsti brašna uvelike ovisi i kvaliteta kruha. Dobro brašno mora zadovoljavati određene uvjete: mora dobro upijati vodu, mora sadržavati odgovarajuću količinu amilolitičkih enzima te, ako nije riječ o bezglutenskom brašnu o čemu će biti riječ u sljedećem poglavlju, treba imati dobro rastezljiv i elastičan gluten. Pri proizvodnji kruha i ostalih pekarskih proizvoda predlaže se upotreba poboljšivača. S obzirom na to da je u novije vrijeme sve veća potreba za što bržim načinima proizvodnje, dolazi do skraćivanja trajanja fermentacije što negativno utječe na miris i okus konačnog proizvoda te njegovu trajnost. Stoga se u zamjesu za kruh dodaju različiti poboljšivači kao što su askorbinska kiselina, različiti emulgatori, enzimi, konzervansi, vlakna te vitamini i mineralne tvari. Njihova uloga je povećati elastičnost i stabilnost tijesta, kvalitetu konačnog pekarskog proizvoda, produžiti im svježinu i trajnost te povećati prehrambenu vrijednost (Anonymous 1).

2.2. Celijakija

Celijakija ili glutenska enteropatija bolest je nepodnošljivosti organizma na protein gluten kojeg nalazimo u pšenici (prolamin i glutenin), raži (sekalin) i ječmu (hordein). U takvim slučajevima, tijelo stvara anti-gliadin antitijela koja napadaju molekule glutena pa dolazi do oštećenja sluznice tankog crijeva i uništavanja crijevnih resica zbog čega one gube resičast izgled i postaju zaravnjene, te dolazi do porasta broja tkivnih limfocita i epitelnih stanica. Dolazi do zadebljanja sluznice crijeva zbog čega se javlja i malapsorpcija važnih nutrijenata kao što su željezo, kalcij, folna kiselina te vitamini topljivi u mastima (A, D, E i K). Često se uz celijakiju javljaju i druge autoimune bolesti, a također je i povećana opasnost od razvijanja malignih bolesti probavnog sustava u odnosu na zdrave osobe (Barbarić, 2008).

Dvadesetih godina prošlog stoljeća, celijakija je bila bolest koja je uglavnom zahvaćala djecu. Očitovala se uobičajenim simptomima koji su se javljali nakon uvođenja raznovrsne krute hrane u prehranu dojenčeta. Oboljela djeca ne bi napredovala na težini, imala bi česte i obilne proljeve uz pojavu vrlo izraženog trbuha. Postala bi vrlo nemirna, nezadovoljna i često uplakana. Danas je celijakija postala vrlo česta bolest koja obuhvaća sve dobne skupine širom svijeta. Studije pokazuju da se celijakija pojavljuje na čak 1:80 ljudi u općoj populaciji, dok je taj omjer u skupinama povećanog rizika deseterostruko češći (Barbarić, 2008). Jedini prihvaćeni oblik liječenja je bezglutenska prehrana. Oboljele osobe moraju izbjegavati svu hranu koja u sebi sadrži protein gluten koji je prisutan u pšenici, ječmu i raži te njihovim proizvodima. One namirnice koje prirodno ne sadrže navede žitarice je potrebno testirati na prisutnost glutena. Testirane namirnice obilježavaju se međunarodnim znakom u obliku prekriženog klasa (slika 1).



Slika 1. Prekriženi klas, simbol bezglutenskog proizvoda (Anonymous 2)

Prema Codex Alimentariusu (CA CX/NFSDU 00/4), bezglutenske namirnice dijele se u tri skupine:

- 1) namirnice koje prirodno ne sadržavaju gluten (maksimalna dozvoljena količina glutena je 20 mg/kg, odnosno $<0,002\%$);
- 2) namirnice koje sadržavaju gluten, ali je on uklonjen tehnološkim postupkom (maksimalna dozvoljena količina glutena je 200 mg/kg, odnosno $<0,02\%$);
- 3) kombinacija namirnica pod 1. i 2., u kojima količina glutena ne smije prelaziti više od 200 mg/kg, odnosno $<0,02\%$.

Postoji i takozvana rizična hrana koja se može konzumirati tek kada se sa sigurnošću utvrdi da ne sadržava gluten. U takvu skupinu namirnica ubrajaju se instant juhe, kobasice, hrenovke, umak od soje, slatkiši i bomboni, instant napitci i sl. U novije vrijeme se u bezglutensku prehranu uključuje i zob, iako se još uvijek vode polemike zbog njene česte kontaminacije s drugim žitaricama. Pokazalo se da uvođenje umjerenih količina zobi, odmah po postavljanju dijagnoze, nema utjecaja na zacjeljivanje sluznice tankog crijeva. Za oboljele od celijakije važno je pridržavati se propisane prehrane jer se tako mogućnost nastanka kasnijih komplikacija svodi na minimum, a osobito je to važno u trenutku poboljšavanja zdravstvenog stanja bolesnika, kada povremena konzumacija glutena ne izaziva vidljive simptome bolesti. Godinu dana nakon uvođenja bezglutenske prehrane očekuje se prva normalizacija seroloških testova, dok je za potpuni oporavak sluznice crijeva potrebno i do osam godina (Peraaho i sur., 2004).

U tijeku su i istraživanja nekih novih oblika liječenja celijakije. Smatra se da bi uzimanje peroralne enzimske terapije omogućilo povremeno unošenje glutena te njegovu razgradnju i

podnošljivost, dok bi se imunomodulatornim lijekovima moglo utjecati na blokiranje crijevne transglutaminaze (deaminira gluten te tako postaje imunotoksičan), lučenje upalnih citokina ili aktivaciju T – limfocita (Barbarić, 2008).

Za osobe oboljele od celijakije, jedna od najvažnijih stvari je edukacija o bolesti i bezglutenskoj prehrani te prepoznavanje deklaracija na proizvodima. Veliku pomoć mogu im pružiti i udruge građana oboljelih od ove bolesti, gdje mogu dobiti mnoge korisne savjete. Također je potrebno stalno praćenje oboljelih kako bi se prepoznali i na vrijeme liječili mogući nutritivni deficiti (Barbarić, 2008).

2.3. Bezglutenski kruh

Kruh se oduvijek koristi u ljudskoj prehrani, no zbog povećanog broja oboljelih od celijakije povećala se i potražnja za bezglutenskim proizvodima. Za oboljele vrlo veliku važnost predstavlja pronalazak proizvoda koji je adekvatna zamjena pšeničnom kruhu, ali i ostalim pekarskim proizvodima koji sadržavaju protein gluten. Zato danas pekarska industrija teži postizanju što kvalitetnijih proizvoda koji bi predstavljali zamjenu glutenskim namirnicama (Panjkota Krbavčić, 2008).

Gluten je najvažniji protein koji se nalazi u pšeničnom brašnu. Njegova glavna osobina je bubrenje u vodi pri čemu dolazi do stvaranja elastične, koherentne smjese koja se tijekom miješenja tijesta pretvara u mrežastu strukturu te čini osnovnu strukturu tijesta (Filipović i sur., 2002).

S druge strane, primjenom žitarica koje ne sadrže gluten, dobiva se tijesto polutekuće konzistencije koje ne može zadržavati plinove nastale tijekom fermentacije pa je dobiveni kruh mrvljive i zbijene strukture, uz ostale nedostatke poput nepoželjne boje i okusa. Zato se u proizvodnji bezglutenskog kruha, ali i ostalih bezglutenskih namirnica, koriste različiti hidrokoloidi, škrob, enzimi, brašna od žitarica koje ne sadržavaju gluten kao što su proso, kukuruz i riža, ili brašna pseudožitarica kao npr. kvinoja ili heljda. Općenito se bezglutenska brašna mogu podijeliti u tri veće skupine:

- 1) krupno mljevena bezglutenska brašna integralnih, cjelovitih žitarica koja se uglavnom ne koriste samostalno, već u kombinaciji s drugim brašnima;
- 2) finije mljevena bezglutenska brašna, tj. mješavine brašna više bezglutenskih žitarica s dodacima poput biljnih vlakana, soli, ekstrakta kvasaca i slično;

3) najfinije mljevena bezglutenska brašna kukuruza, krumpira, degluteniziranog pšeničnog brašna i slična koja su već dodana gotovim mješavinama ili ih se samostalno dodaje u vrlo malom postotku (Panjkota Krbavčić, 2008).

Manom gotovih industrijskih mješavina bezglutenskog brašna se u novije vrijeme smatra smanjena nutritivna vrijednost krajnjeg proizvoda. Ona se osim različitim mješavinama brašna, može dodatno povećati i dodatkom sjemenki. Također se sve više i pribjegava mješavinama bez aditiva pa se umjesto industrijskih stabilizatora i zgušnjivača dodaju psyllium ljuskice te lanene ili chia sjemenke (Anonymous 3).

2.4. Mahunarke

Nakon žitarica, mahunarke predstavljaju drugu najzastupljeniju poljoprivrednu kulturu na svijetu. Sadrže složene ugljikohidrate (prehrambena vlakna, rezistentni škrob i oligosaharide), visok udio proteina bogatih aminokiselinom lizinom, vitamine B skupine i željezo te obiluju antioksidansima i polifenolima. Uz to, ne sadržavaju gluten te imaju nizak glikemijski indeks zbog čega učestala konzumacija mahunarki dovodi do smanjenja rizika od pojave kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, prekomjerne tjelesne mase te celijakije (Han i sur., 2009). Od nenutritivnih sastojaka, mahunarke sadrže i alkalioide, tanine i rafinoze. Ti spojevi su termolabilni pa se vrlo lako mogu ukloniti upotrebom toplinskih tretmana (Muzquiz i sur., 2012).

U proteklih 30 godina, provedene su brojne studije za analizu učinka dodavanja brašna mahunarki na funkcionalna svojstva tijesta i kruha. Te studije uključivale su brašna graška, slanutka, leće i graha te dobiveni rezultati pokazuju da brašna mahunarki predstavljaju odličnu alternativu za proizvodnju bezglutenskih proizvoda (De la Hera i sur., 2012).

2.4.1. Grašak

Grašak, *Pisum sativum* L., jednogodišnja je biljka iz porodice mahunarki. Ima tanku, razgranatu, uspravnu ili povijenu stabljiku koja naraste i do 150 cm. Korijen je dobro razgranat i dug oko jednog metra, a listovi su parno perasti. Cvjetovi su dvospolni i nepravilni, dok čašku čini pet zelenih lapova oblikovanih u zvono. Tučak ima nadraslu podnicu te nosi više sjemenih zametaka, a prašnika ima deset. Plod čini do 12 cm duga mahuna koja sadrži oko 2 do 12 okruglastih jestivih sjemenki zbog čega se uzgaja kao

povrtna kultura. Grašak potječe iz Male Azije i istočnog Sredozemlja, a u naše krajeve je stigao u brončano doba (Anonymous 4).

2.4.1.1. Brašno graška

Kemijski i nutritivni sastav brašna graška određen je u eksperimentu koje su proveli Kohajdova i sur. (2013). Utvrđeno je da brašno graška sadrži visok udio proteina, mineralnih tvari i prehrambenih vlakana te da ne sadrži gluten zbog čega je povoljno koristiti ga u bezglutenskoj prehrani. Brašno graška je cjelovito brašno koje može u potpunosti zamijeniti pšenično brašno pa se može koristiti u pripremi kruha i peciva, ali i tjestenine i keksa.

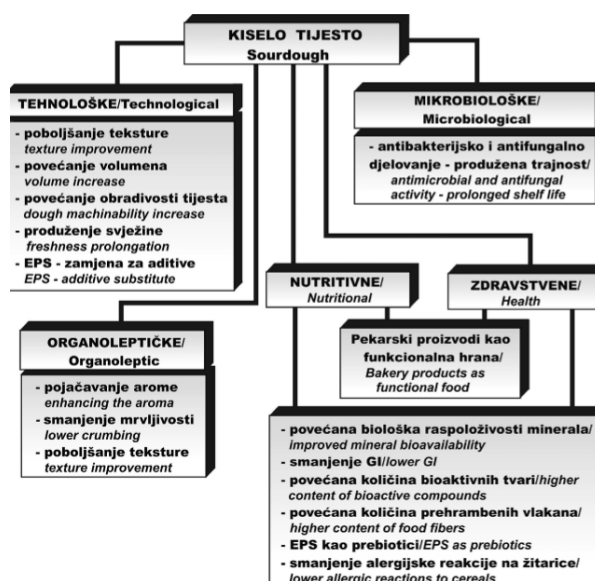
2.5. Kiselo tijesto

Kiselo tijesto produkt je fermentacije koju provode bakterije mliječne kiseline (BMK) i kvasci u aktivnom stanju. BMK koje se koriste za proizvodnju kiselog tijesta mogu se izolirati iz samih žitarica, ali mogu se pojaviti uslijed kontaminacije pekarskog kvasca ili kontaminacije u pekarskoj industriji. Najčešće se koriste BMK iz rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* *Weisella* i *Leuconostoc* (De Vuyst i Neysens, 2005).

Tijekom fermentacije tijesta, djelovanjem mikroflore kiselog tijesta, dolazi do brojnih biokemijskih promjena ugljikohidrata i proteina brašna (Gänzle i sur., 2007). Mehanizam djelovanja BMK može se podijeliti na dva efekta: primarni i sekundarni efekt zakiseljavanja, pri čemu je njihov ukupni rezultat povećanje kvalitete kruha i drugih pekarskih proizvoda (Mrvčić i sur., 2011). Snižanjem pH prvenstveno se utječe na povećanje topivosti glutena čime se mijenja reologija tijesta. Zbog povećanja pozitivnog naboja dolazi do povećanja njegove topivosti što posljedično vodi do slabljenja glutenske mreže pa gluten ima bolji kapacitet za vezanje vode i CO₂. S kontinuiranim padom pH vrijednosti povećava se aktivnost određenih enzima, kao što su proteinaze koje kataliziraju reakcije hidrolize proteina žitarica (pa tako i glutena), što rezultira ublažavanjem simptoma celijakije i povećanjem probavljivosti aminokiselina. Povećava se i aktivnost fitaza što omogućuje povećanu dostupnost mineralnih tvari (Lopez i sur., 2003), a smanjuje se aktivnost amilaza čime se smanjuje glikemijski indeks pekarskih proizvoda i povećava se svježina kruha (Östman i sur., 2002). Djelovanjem BMK nastaju egzopolisaharidi (EPS), glukani (reuteran, dekstran, mutan) i fruktani (levan i inulin) za koje je dokazano da, osim na organoleptička, povoljno djeluju i

na nutritivna svojstva pekarskih proizvoda (De Vuyst i sur., 2001). Na slici 2. prikazane su prednosti proizvodnje kruha i pekarskih proizvoda uz dodatak kiselog tijesta.

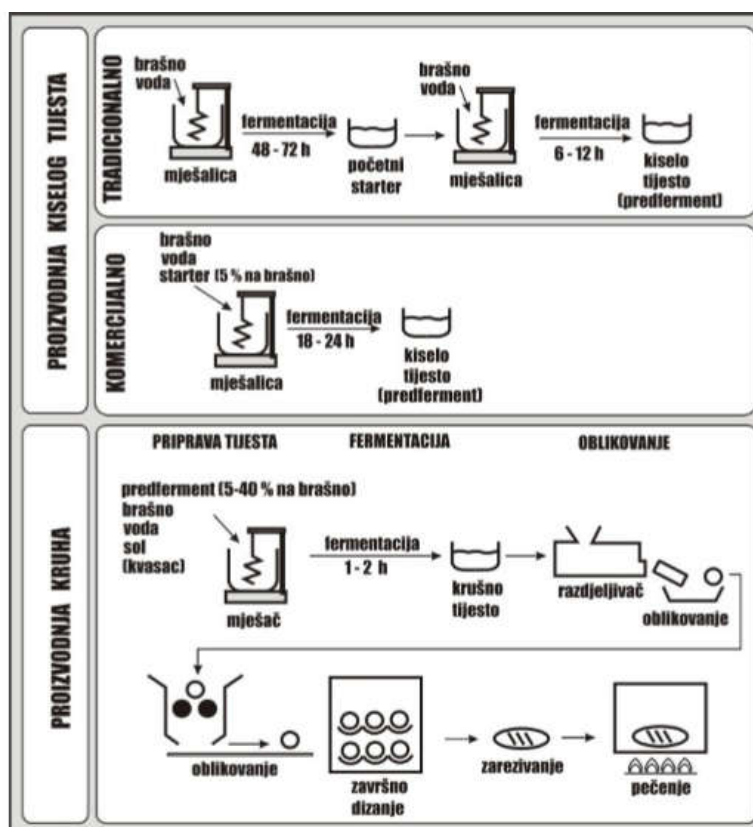
Potrošači u Hrvatskoj još uvijek ponajviše konzumiraju bijeli pšenični kruh dobiven direktnim postupkom proizvodnje uz pomoć pekarskog kvasca, iako takav kruh ima slabije izražena organoleptička svojstva poput mirisa, okusa i produljene trajnosti, a uz to je i siromašan na nutritivnom sastavu. U cilju je što više osvijestiti potrošače na dobrobiti kiselog tijesta kako bi se što više uvrstilo u svakodnevnu prehranu (Mrvčić i sur., 2011).



Slika 2. Prednosti proizvodnje pekarskih proizvoda s dodatkom kiselog tijesta (Mrvčić i sur., 2011)

2.6. Tehnološki procesi u proizvodnji kiselog tijesta

Tijesto se može kiseliti na više načina (slika 3). Postupak kiseljenja se može provoditi ručno u plastičnim posudama ili posudama za zamjes, ili automatiziranim procesom u fermentatoru. Metode proizvodnje kiselog tijesta mogu biti jednostupanjske, dvostupanjske ili višestupanjske. Jednostupanjske metode se najčešće koriste za proizvodnju pšeničnog kiselog tijesta, dok se za proizvodnju kiselog tijesta od raženog brašna koristi višestupanjska metoda, najčešće trostupanjska. Kiselo tijesto može se proizvoditi spontanom fermentacijom ili uz dodatak komercijalnih starter kultura koje obavezno sadrže jednu ili više vrsta BMK te mogu sadržavati i određene vrste kvasaca (Mrvčić i sur., 2011).



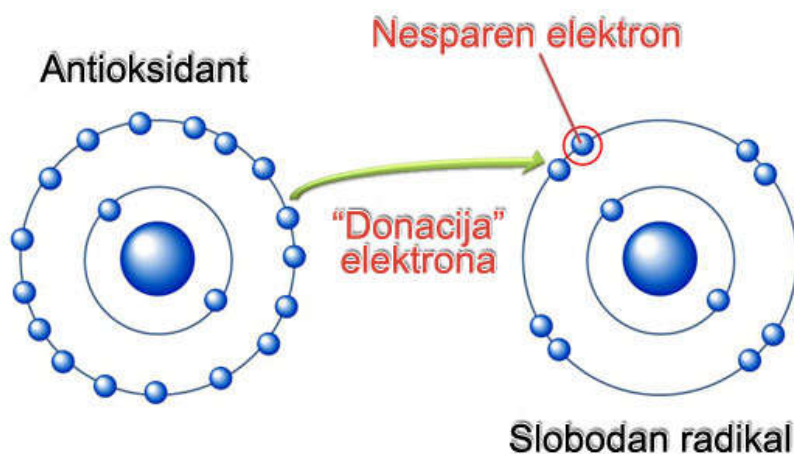
Slika 3. Opća shema proizvodnje kiselog tijesta i kruha uz dodatak kiselog tijesta (Mrvčić i sur., 2011)

2.7. Oksidacijski stres i antioksidansi

Oksidacijski stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Tijekom oksidacijskog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, molekula koje imaju nespareni elektron i zbog toga su izuzetno reaktivne. Ta reaktivnost im omogućuje da mogu donirati ili primiti elektron od drugih molekula, ponašajući se kao oksidansi ili reducensi, a novonastali slobodni radikal reagira s drugim molekulama pri čemu se reakcija stalno ponavlja te dolazi do oštećenja staničnih struktura. Slobodni radikali tako oštećuju molekule kao što su nukleinske kiseline, lipidi, proteini i ugljikohidrati (Puljak i sur., 2004). Postoje endogeni ili unutrašnji te egzogeni ili vanjski izvori slobodnih radikala u čovjeka. Svakodnevni način života uz povećanu dozu stresa, fizičkog opterećenja i nesanicu dovodi do njihove povišene produkcije. Vanjski izvori su određeni lijekovi, smog, teški metali i kemikalije, alkohol i sl., dok su unutrašnji izvori upale i imunološke obrane organizma. Prekomjerno lučenje slobodnih radikala i nastanak

oksidacijskog stresa dovodi do nastanka brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, dijabetes te autoimune bolesti. Posljedice oksidacijskog stresa izraženije su u ljudi starije životne dobi, kod kojih je i povećana prisutnost navedenih poremećaja. Međutim, zdravijim načinom života i pravilnijom prehranom uvelike možemo utjecati na pojedine izvore slobodnih radikala u organizmu (Chandra i sur., 2010).

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju lančanu reakciju te pretvaraju slobodne radikale u oblike koji su organizmu neškodljivi. Djeluju tako da doniraju vodikov atom radikalima i na taj način sprječavaju daljnja oštećenja (slika 4).



Slika 4. Mehanizam djelovanja antioksidansa (Anonymous 5)

Antioksidansi se moraju neprestano obnavljati u tijelu, kako bi se uspostavila ravnoteža između njih i slobodnih radikala. Dijelimo ih u tri osnovne skupine:

- 1) primarni antioksidansi koji sprječavaju nastajanje slobodnih radikala,
- 2) sekundarni antioksidansi koji uništavaju već stvorene slobodne radikale,
- 3) tercijarni antioksidansi koji ispravljaju oštećenja stanica nastala djelovanjem slobodnih radikala.

Osim u primarne, sekundarne i tercijarne, antioksidansi se dijele i u enzimске, neenzimske te izvanstanične. Od enzimskih najznačajniji su superoksiddismutaze (SOD), katalaze (CAT), enzimi glutacion redoks ciklusa (glutacion peroksidaze, glutacion-S-transferaze, glutacion-reduktaze, fosfolipid-hidroperoksid i sl.), zatim citokrom-oksidge, kao i tioredoksin i peroksiredoksin proteini koji djeluju kao sakupljači superoksida i vodikovog peroksida (Guemouri i sur., 1991). Neenzimske komponente se dijele na one topljive u vodi i one topljive u mastima. Najznačajniji neenzimski antioksidansi topljivi u vodi su vitamin C (askorbinska kiselina), mokraćna kiselina, albumin, transferin, feritin, bilirubin, cistein,

histidin i slični, a od topljivih u mastima vitamin E (α -tokoferol, najznačajniji antioksidans), provitamin A (β -karoten) i koenzim Q (ubikinon). Osim antioksidativne aktivnosti unutar stanica, postoji i ekstracelularna obrana od slobodnih radikala jer se velik broj radikala lako prenosi s mjesta nastanka u ostale stanice u organizmu. U takvu skupinu antioksidanasa spadaju uglavnom metaloproteini koji sadrže željezo i bakar u nereaktivnom stanju te tako sprječavaju njihovo djelovanje sa superoksidom i vodikovim peroksidom (Marklaud i sur., 1982). Tu ubrajamo još i proteine kao što su transferin, lakroferin, hemopeksin, albumini, bilirubin i urate.

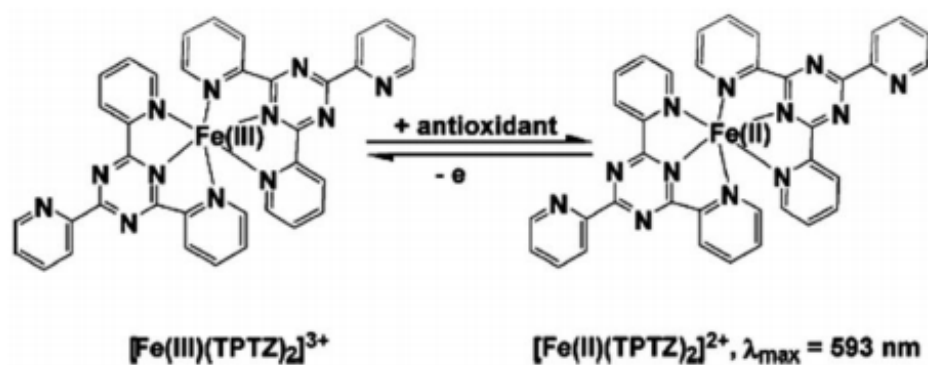
Iako ljudski organizam posjeduje veliki broj antioksidanasa, u situacijama povećane produkcije slobodnih radikala u organizmu, mehanizmi antioksidativne zaštite ih ne mogu ukloniti u potpunosti. Iz tog razloga poseže se za dodatnim načinima za povećanje njihove učinkovitosti, kao što je npr. povećani unos antioksidanasa putem prehrane i drugi (Anonymous 5).

2.8. Metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta

Razvijen je veliki broj metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta koje se temelje na različitim mehanizmima obrambenog sustava antioksidanasa, kao što je uklanjanje ili inhibicija slobodnih radikala. Metode se dijele na direktne metode (ORAC metoda, određivanje antioksidacijskog kapaciteta s β -karotenom) i na indirektne metode (DPPH i FRAP). S obzirom da je FRAP metoda korištena u ovom istraživanju, bit će pobliže objašnjena.

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – antioksidativna moć redukcije željeza) metodu razvili su Benzie (1996) i Benzie i Strain (1996). Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu dolazi do nastanka plavo obojenog kompleksa koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Benzie i Strain, 1996). Reakciju je potrebno provoditi u kiselom mediju, pri pH=3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima dolazi do smanjenja ionizacijskog potencijala koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno dolazi i do povećanja redoks potencijala koji dodatno omogućuje pomak ravnoteže reakcije u smjeru prijenosa elektrona. Redoks potencijal reakcije $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ iznosi 0,77 V pa će svi spojevi koji imaju niži redoks potencijal od željeza ulaziti u reakcije njegove redukcije i na taj način doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (slika 5) (Benzie i Strain, 1996). Reakcija prijenosa elektrona se odvija relativno brzo pa se njome može opisati antioksidacijski kapacitet

fenolnih spojeva koji ulaze u reakciju veoma brzo, dok za one spojeve s dužim vremenskim pomakom u mehanizmu djelovanja, ova metoda nije izrazito prikladna.



Slika 5. Redukcija željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Anonymous 6)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Analizirano je 8 uzoraka kiselog tijesta (KT) i 8 uzoraka kruha pripremljenih na različite načine – sa i bez dodatka brašna žutog graška u recepturu, sa i bez fermentacije pomoću BMK roda *Lactobacillus* – *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* ili *Lactobacillus brevis*. Za svaki uzorak napravljene su dvije paralelne ekstrakcije i dvije paralelne fermentacije. U tablici 1 navedene su njihove oznake.

Tablica 1. Oznake uzoraka kiselog tijesta i kruha

Oznaka	Opis
0±G KT 0± G KRUH	Uzorak bez procesa kiseljenja, sa/bez brašna žutog graška
LR±G KT LR±G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L.reuteri</i> , sa/bez brašna žutog graška
LB ±G KT LB ±G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L.brevis</i> , sa/bez brašna žutog graška
LF ±G KT LF ±G KRUH	Priprema kiselog tijesta s <i>L.fermetum</i> , sa/bez brašna žutog graška

Popis korištenog laboratorijskog pribora:

- tikvica od 100 mL
- stakleni lijevak
- metalne žličice
- boca od tamnog stakla
- pipetmani
- nastavci za pipetmane
- plastične kivete
- analitička vaga
- spektrofotometar
- uređaj za termostatiranje

Popis korištenih kemikalija:

- octena kiselina; 99,5 %, Macron, Njemačka
- natrijev acetat trihidrat; 99,5 %, Lachner s.r.o., Češka Republika
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (trolox) 97 %, Sigma - Aldrich, Rusija
- TPTZ; Alfa Aesar GmbH & Co KG, Njemačka
- željezov (III) klorid heksahidrat; 99 %, Kemika, Hrvatska
- klorovodična kiselina; 34-37 %, Carlo Erba, Italija
- metanol; HPLC Grade, J. T. Baker, Netherlands

3.2. Metode rada

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva prisutnih u uzorcima korištena je FRAP metoda. Prije samog provođenja metode potrebno je pripremiti FRAP reagens miješanjem 2,5 mL 20 mM željezovog (III) klorida heksahidrata, 2,5 mL 10 mM TPTZ pomiješanog u 40 mM HCl-u te uz dodatak 25 mL 300 mM acetatnog pufera.

Postupak određivanja:

Prethodno pripremljeni ekstrakti uzoraka se otope u 200 μ L metanola. Potom se u mikrokivetu otpipetira 10 μ L ekstrakta i doda se 1 mL FRAP reagensa. Dobivenu otopinu potrebno je dobro promućkati i ostaviti 4 minute u tami kako bi se provela reakcija redukcije TPTZ-a. U slijepu probu otpipetira se sve osim uzorka, a umjesto njega dodaje se 10 μ L metanola. Nakon provedene reakcije u tami, izmjeri se apsorbancija pri 593 nm. Mjerenja se provode u dvije paralele, a dobiveni rezultati izražavaju se pomoću baždarne krivulje izrađene sa 6 koncentracija Troloxa, u obliku množine ekvivalenata Troloxa s obzirom na suhu tvar uzorka.

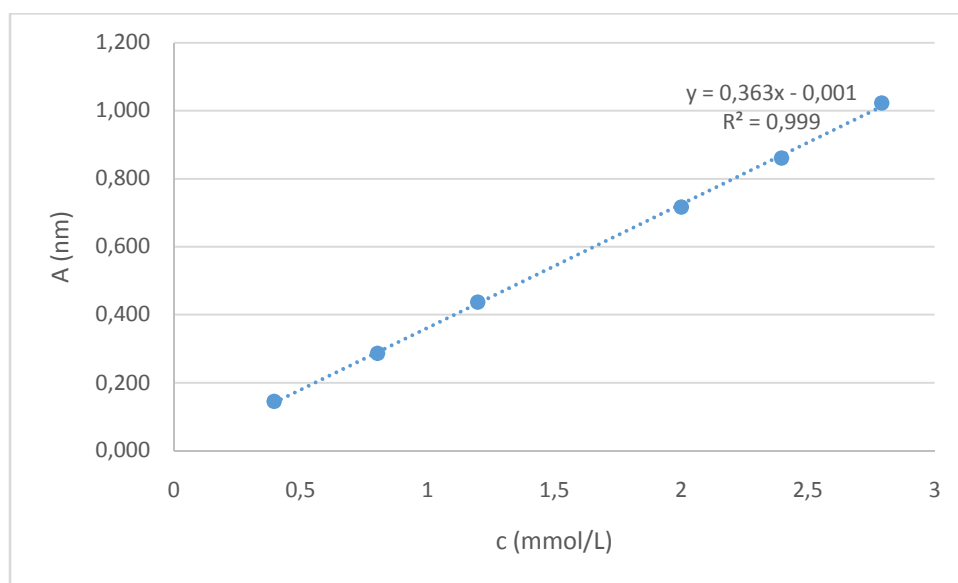
3.2.1. Obrada podataka

Dobiveni rezultati su statistički obrađeni u programu MS Excel 2013. Izračunata je srednja vrijednost, standardna devijacija te relativna standardna devijacija svih provedenih mjerenja. Rezultati su prikazani u obliku množine ekvivalenata Troloxa (TE) s obzirom na suhu tvar uzorka.

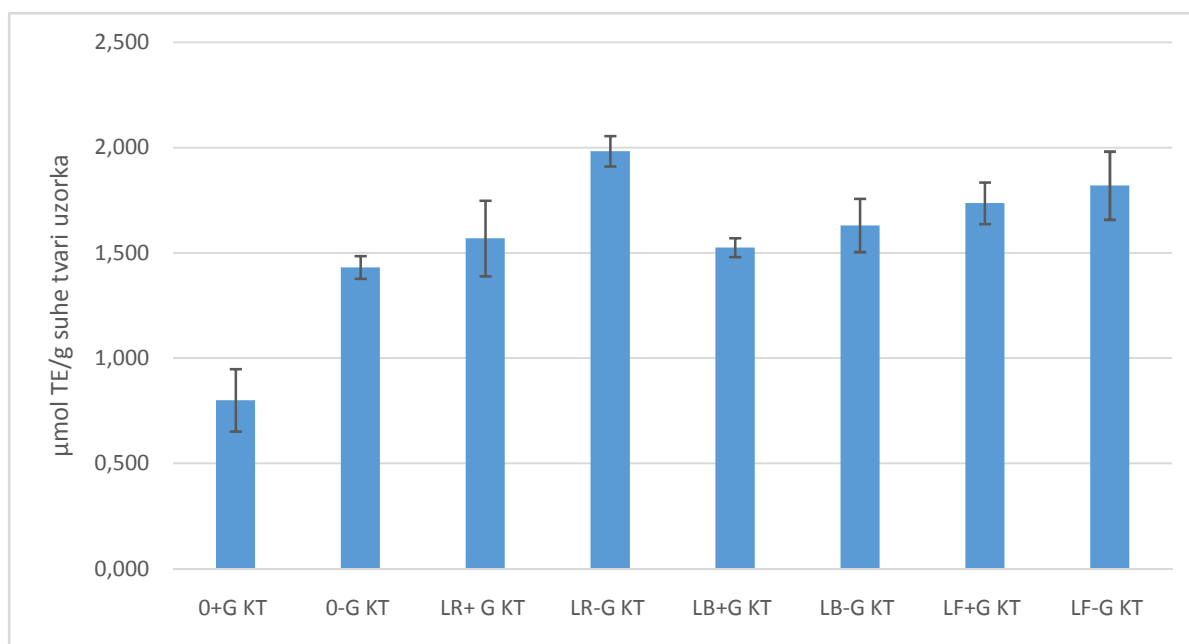
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom završnom radu određivan je utjecaj dodatka brašna žutog graška na antioksidacijsku aktivnost bezglutenskog kruha i kiselog tijesta. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (slika 7, 8).

Baždarni dijagram izrađen je pomoću izmjerenih apsorbancija i poznatih koncentracija Troloxa na 6 koncentracijskih razina. Iz izmjerenih apsorbancija nacrtan se baždarni pravac tako što se na apscisu nanese koncentracije standardne otopine Troloxa (mmol/L), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancija pri 593 nm (slika 6).



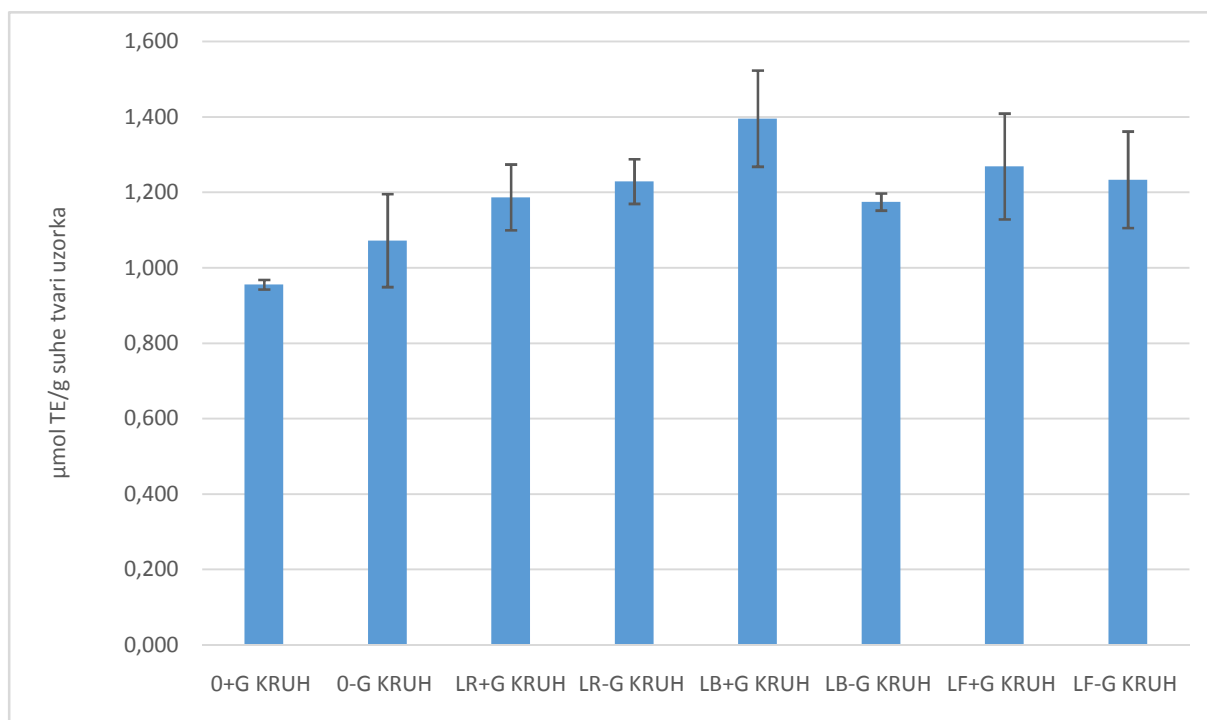
Slika 6. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije (A) o množinskoj koncentraciji (c) za Trolox



Slika 7. Antioksidacijska aktivnost uzoraka kiselog tijesta

Uzorak tijesta bez kiseljena i bez dodatka brašna graška ima 78 % veću antioksidacijsku aktivnost od uzorka s graškom (slika 7). Kiselo tijesto s dodatkom kulture *L.reuteri* bez dodatka brašna graška ima 26 % veću antioksidaciju aktivnost od kiselog tijesta s dodatkom brašna graška (slika 7). Kiselo tijesto s dodatkom kulture *L.brevis* bez dodatka brašna graška ima 7 % veću antioksidaciju aktivnost od kiselog tijesta s dodatkom brašna graška (slika 7). Kiselo tijesto s dodatkom kulture *L.fermentum* bez brašna graška ima 4,8 % veću antioksidaciju aktivnost od kiselog tijesta uz dodatak brašna graška (slika 7). Iz grafičkog prikaza (slika 7) vidljivo je da dodatak brašna graška utječe na smanjenje antioksidacijske aktivnosti uzoraka kiselog tijesta.

Također, uzorci kod kojih je provedeno kiseljenje s dodatkom BMK pokazali su veću antioksidacijsku aktivnost od uzorka bez procesa kiseljenja s BMK (slika 7). U odnosu na uzorak bez brašna graška i bez procesa kiseljenja, kiselo tijesto pripremljeno s različitim bakterijama BMK ima veću antioksidativnu aktivnost – 38 % za *L.reuteri*, 14 % za *L.brevis* i 27 % za *L.fermentum* (slika 7).



Slika 8. Antioksidacijska aktivnost uzoraka kruha

Uzorak kruha bez kiselog tijesta i dodatka brašna graška ima 12 % veću antioksidacijsku aktivnost od uzorka s dodanim brašnom graška (slika 8). Kruh s kiselim tijestom pripremljenim s *L.reuteri* i bez dodatka brašna graška ima 4 % veću antioksidacijsku aktivnost od kruha s dodatkom brašna graška (slika 8). Kruh s kiselim tijestom pripremljenim s *L.brevis* i uz dodatak brašna graška ima 16 % veću antioksidacijsku aktivnost od kruha bez brašna graška (slika 8). Kruh s dodatkom kulture *L.fermentum* i uz dodatak brašna graška ima 3 % veću antioksidacijsku aktivnost od kruha bez dodatka brašna graška (slika 8). Iz grafički prikazanih rezultata (slika 8) vidljivo je da dodatak brašna graška utječe na smanjenje antioksidacijske aktivnosti u slučajevima kruha bez dodatka kiselog tijesta i kruha s kiselim tijestom pripremljenim s *L.reuteri*, dok u uzorcima kruha s kiselim tijestom pripremljenim s *L.brevis* i *L.fermentum* je došlo do povećanja antioksidacijske aktivnosti dodatkom brašna graška.

Uspoređujući rezultate određivanja antioksidativne aktivnosti kruha bez dodatka brašna graška i procesa kiseljenja, kod uzoraka kruha s dodatkom kiselog tijesta pripremljenog s *L. reuteri*, *L. brevis* i *L. fermentum* došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti za 13 %, 8,8 % i 13 % (slika 8).

Brašno ima određenu antioksidativnu aktivnost koja se mijenja tijekom fermentacije i pripreme kruha. S obzirom na to da utjecaj fermentacije pomoću BMK na antioksidativnu aktivnost nije upotpunosti poznat, u današnje vrijeme se taj utjecaj intenzivno istražuje. Prema istraživanju koje su proveli Katina i sur. (2007), utvrđeno je da se kiseljenjem tijesta povećava raspoloživost lignana, ferulinske kiseline te drugih fitokemikalija. Zbog utjecaja niskog pH, koji nastaje kao posljedica kiseljenja tijesta, dolazi do stabilizacije nestabilnih bioaktivnih komponenti. Fermentacija ima pozitivan učinak na sadržaj ukupnih fenola i na antioksidacijsku aktivnost, a stupanj utjecaja fermentacije ovisi o vrsti mikroorganizma. Fenolni spojevi imaju antioksidativna svojstva zbog prisutnosti aromatskog fenolnog prstena koji može sintetizirati i delokalizirati nespareni elektron u okviru svog aromatskog prstena (Rice – Evans i sur., 1997).

Prema rezultatima određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka kruha i kiselog tijesta vidljivo je da najvišu antioksidacijsku aktivnost pokazuje kiselo tijesto (slika 7) pripremljeno dodatkom kulture *L.reuteri* i bez dodatka brašna graška (1,983 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari uzorka), dok u slučaju kruha (slika 8) najveću antioksidativnu aktivnost pokazuje uzorak pripremljen dodatkom kiselog tijesta pripremljenog kulturom *L.brevis* (1,396 $\mu\text{mol TE/g}$ suhe tvari uzorka). Uspoređujući rezultate određivanja antioksidacijske aktivnosti kruha (slika 8) i kiselog tijesta (slika 7) u uzorcima bez dodatka brašna graška, vidljivo je da kiselo tijesto fermentirano kulturom *L.reuteri* pokazuje 62 % veću antioksidacijsku aktivnost od istog uzorka kruha. Također, kiselo tijesto fermentirano s *L.fermentum* ima 28 %, a fermentirano s *L.brevis* 32 % veću antioksidacijsku aktivnost od uzoraka kruha s dodatkom istog kiselog tijesta (slika 7, slika 8).

U većini slučajeva kiselo tijesto, neovisno o dodatku brašna graška i primijenjenim BMK, ima veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na uzorke kruha pripremljene iz istog tijesta, i to u rasponu od 9 % do 62 % (slika 7, slika 8). Iznimka je kruh pripremljen s dodatkom brašna graška i bez dodatka kiselog tijesta čija je antioksidativna aktivnost bila veća za 16 % od antioksidativne aktivnosti istog tijesta (slika 7, slika 8).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedene rasprave i dobivenih rezultata, možemo zaključiti sljedeće:

- Dodatak brašna žutog graška negativno utječe na antioksidativnu aktivnost kod svih uzoraka kiselog tijesta i uzorka kruha bez dodatka kiselog tijesta i kruha s kiselim tijestom pripremljenim s *L. reuteri*.
- Proces kiseljenja tijesta s dodatkom bakterija mliječne kiseline ima pozitivan učinak na antioksidacijsku aktivnost. Tijekom mliječno-kisele fermentacije dolazi do povećanja antioksidativne aktivnosti kiselog tijesta fermentiranog bakterijama *L. reuteri*, *L. brevis* i *L. fermentum*, a time i kruha s njegovim dodatkom.
- Kiselo tijesto, neovisno o dodatku brašna graška i primijenjenim bakterijama mliječne kiseline, ima veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na kruh pripremljen od istog tijesta.

6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2013) Tehnološki procesi u pekarskoj industriji, <http://www.kvasac.hr/tehnoloski_procesi.html>. Pristupljeno 14. kolovoza 2017.
- Anonymous 2 (2013) Gluten-free, < <https://theseasideinn.com/gluten-free/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2017.
- Anonymous 3 (2016) Kratak uvod u bezglutenska brašna, <<http://www.abeona.hr/hr/blog/kratak-uvod-u-bezglutenska-brasna>>. Pristupljeno 07.kolovoza 2017.
- Anonymous 4 (2014) Grašak – *Pisum sativum* L., <<http://www.plantea.com.hr/grasak/>>. Pristupljeno 23. srpnja 2017.
- Anonymous 5 (2015) Antioksidansi – jesu li nam doista potrebni, <http://zena.rtl.hr/clanak/ostalo_na_temu_zdravlja/antioksidansi_jesu_li_nam_doista_potrebni/11233>. Pristupljeno 20. srpnja 2017.
- Anonymous 6 (2015) Antioxidant, <<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>>. Pristupljeno 20. srpnja 2017.
- Barbarić I. (2008) Celijakija – pregled i predviđanja. *Medicina* **2008** **44**: 229-234.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239**: 70-76.
- Chandra N.,Lobo V., Patil A., Phatak A. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on humanhealth.*Pharmacognosy Reviews* **4**:118-126.
- De la Hera E., Ruiz-Paris E., Oliete B., Gómez, M. (2012) Studies on the quality of cakes made with wheat-lentil composite flours. *LWT-Food Science and Technology* **49**: 48-54.
- De Vuyst L., De Vin F., Vanningelgem F., Degeest B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **11**: 687-707.
- De Vuyst L., Neysens P. (2005) The sourdough micro ora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology* **16**: 43-56.

- Filipović N., Simović D., Filipović J. (2002) Uloga laboratorijske kontrole u ispitivanju kvaliteta brašna i hleba. *PTEP 6* **1**: 28-31.
- Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R.F. (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* **2**: 128-138.
- Guemouri L., Artur Y., Herbeth B., Jeandel C., Siest G. (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry* **37**: 1932-1937.
- Han J., Janz J. A. M., Gerlat M. (2010) Development of gluten-free cracker snacks using pulse flours and fractions. *Food Research International* **43**: 627-633.
- Katina K., Liukkonen K.H., Kaukovirta-Norja A., Adlercreutz H., Heinonen S.M., Lampi A.M., Pihlava J.M., Poutanen K. (2007) Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science* **46**: 348-355.
- Kohajdová Z., Karovicová J., Magala M. (2013) Rheological and qualitative characteristics of pea flour incorporated cracker biscuits. *Croatian Journal Food Science and Technology* **5**: 11-17.
- Lopez H.W., Duclos V., Coudray C., Krespine V., Feillet Coudray C., Messenger A., Demigné C., Rémésy C. (2003) Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition* **19**: 524-530.
- Marklund S.L., Holme E., Hellner L. (1982) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chimica Acta* **125**: 41-51.
- Mrvčić J., Mikelec K., Stanzer D., Križanović S., Bačun-Dužina V., Stehlik-Tomas V. (2011) Sourdough - Traditional Methods for Improving Quality of Bakery Products. *Croatian Journal of Food technology, Biotechnology and Nutrition* **6**: 89-99.
- Muzquiz M., Varela A., Burbano C., Cuadrado C., Guillaumon E., Pedrosa M. (2012) Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. *Implications for nutrition and health* **11**: 227-244.
- Östman E.M., Liljeberg H.G. M., Björck E., Björck I.M. E. (2002) Barley Bread Containing Lactic Acid Improves Glucose Tolerance at a Subsequent Meal in Healthy Men and Women. *Journal of Nutrition* **132**:1173-1175.
- Peraaho M., Kaukinen K., Mustalahti K., Vuolteenaho N., Maki M., Laippala P., Collin P. (2004) Effect of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease. *A randomized study. Scand J Gastroenterol* **39**:27-31.

Puljak A., Perko G., Mihok D., Radašević H. (2004) Antioksidansi i oligementi u starijih ljudi. *Medix* **52**: 98-102.

Rice-Evans C.A., Miller N.T., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **4**: 304-309.

Sakač A., Torbica A., Sedej I., Hadnađev M. (2011) Influence of breadmaking on antioxidant capacity of gluten free breads based on rice and buckwheat flours. *Food Research International* **44**: 2806-2813.

Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratapa, V. M., Singh, V. (2012) Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry* **131**: 462-468.

Zarkadas M., Cranney A., Case S., Molloy M., Switzer C., Grahm I. D., Butzner J. D., Rasjid M., Warren R. E., Burrows V. (2006) The impact of a gluten-free diet on adults with coeliac disease: results of a national survey. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **19**: 41-49.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tina Rora

ime i prezime studenta